取扱説明書

Product manual

Enhanced chemiluminescent substrates for Western Blot

Reagents for Genomics and Proteomics

製造元会社概要

Cyanagen社は、そのハイレベルな技術と学際的な知識により、蛍光マーカーおよび化学発光基質の開発分野において、他に類を見ないイタリアを代表する化学メーカーです。

すぐにご利用いただける蛍光マーカーが 100 種以上を誇る豊富なカタログや、可能な組み合わせが 60 通り以上に上る「架橋剤」からビオチン化用試薬まで、Cyanagen社はお客様のアッセイ開発の可能性を劇的に広げることにご協力可能です。

Cyanagen社は、ISO9001 を取得する品質マネジメントシステムの認証機関です。

説明書

WESTAR

Supernova

ウエスタンブロット用
増強化学発光基質

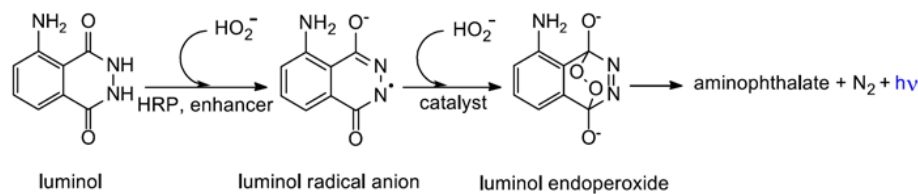
www.cyanagen.com

目次

1. はじめに

ペルオキシダーゼによって触媒されたルミノールの酸化は、425 nmのわずかな発光を生成します。バッファーへの電子伝達メディエーターの組み込みは、長期間にわたる発光シグナルを増強し、シグナル強度および持続時間の点で、大幅に反応の分析的特性を改善します。[1,2] 今日の研究 [3-6] では、適切なアシル化触媒を添加することにより、放射される発光強度が飛躍的に増加されることが証明されています。

HO_2^- HRP, enhancer → HO_2^- catalyst → aminophthalate + N_2 + hν

luminol　luminol radical anion　luminol endoperoxide

検出試薬である WESTAR は、ルミノールの化学発光に基づく同位体ではない基質で、タンパク質および固定化された核酸の化学発光検出のために設計されており、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）と結合します。
WESTAR は研究目的の為のみに開発されたものであり、臨床試験または診断目的で使用することはできません。

参考文献:

1. Kricka, L.J. (2000) *Methods Enzymol.* 305, 370-390.
2. Heindl, D. and Josel, H.P. (1997) *Non-radioactive Analysis of Biomolecules*, 258-261. Springer, Berlin.
3. Marzocchi, E., Grilli. S., Della Ciana, L., Prodi, L., Roda, A. and Mirasoli, M., (2008) *Anal. Biochem*, 377, 189-194.
4. Vdovenko, M. M., Della Ciana, L., Sakharov, I. Yu., (2009) *Anal. Biochemistry*, 392, 54-58.
5. Vdovenko, M. M., Della Ciana, L., Sakharov, I. Yu., (2010) *Biotechnology Journal* 5(8),886-90.
6. Vdovenko, M.M., Zubkov, A.V., Kuznetsova, G.I., Della Ciana, L., Kuzmina, N.S., Sakharov, I. Yu., (2010) *J Immunol Methods*, 362 (1-2), 127-130.

保存方法

お受け取り後は 4℃ で保管してください。

基質WESTARの選択ガイドライン

WESTAR	Supernova	EtaC Ultra	EtaC	Nova 2011	ECL-SUN
シグナル感度	極めて高い	非常に高い	高い	中程度	スタンダード
シグナルの継続期間	短い	中間	良好	長い	かなり長い
タンパク質量	極めて低量	低量	普通	高量	高量

2. 構成部品、並びにその他必要材料

付属部品

- ☒ **溶液** A: ルミノール溶液/増強剤 （琥珀色のプラスチックボトル）
- ☒ **溶液** B: 過酸化水素溶液（ホワイトのプラスチックボトル）

その他必要とする溶液

溶液	調整	
ランニング バッファー	**ランニングバッファー 1 L に対し** 10x (**ストック溶液**): ☒ TRIS (250mM) 30,3 g ☒ グリシン(1.9M) 144,0 g ☒ SDS (1% w/v) 10,0 g ☒ 蒸留水で 1L に希釈する	**ランニングバッファー 1 L に対し**: ☒ **10 倍**濃縮ランニングバッファー 100mL ☒ 蒸留水で 1L に希釈する
トランスファー バッファー	**トランスファーバッファー 1 L に対し** 10x (**ストック溶液**): ☒ TRIS (250mM) 30,3 g ☒ グリシン(1.9M) 144,0 g ☒ 蒸留水で 1L に希釈する	**トランスファーバッファー 1L に対し**: ☒ **10 倍**濃縮トランスファーバッファー ☒ メタノール 200mL ☒ 蒸留水で 1L に希釈する
TBS -T バッファー	TBS -T **バッファー 1 L に対し** 10x (**ストック溶液**): ☒ TRIS-HCl (20mM) 24,23 g ☒ NaCl (136mM) 80,06 g ☒ 蒸留水で 800mL に希釈する ☒ pH が 約 7,6 になるまで 1M の NaOH を追加する。 ☒ 蒸留水で 1L に希釈する	TBS -T **バッファー 1 L に対し** : ☒ 10 倍濃縮 TBS バッファー100ml ☒ 攪拌しながら Tween-20 を 1 mL 加える。 ☒ 蒸留水で 1L に希釈する
ブロッキング バッファー	**5%の無脂肪乳粉末と**: ☒ 無脂肪乳粉末 5 g ☒ 1 **倍の** TBS -T **バッファー**100ml 中に溶解する	5% **の** BSA **と**: ☒ BSA (フラクション V 含む) 5 g ☒ 1 **倍の** TBS -T **バッファー**100ml 中に溶解する
ポンソー染色溶液	**ポンソー染色溶液** 100mL **に対し** 10x (**ストック溶液**): ☒ 1.0ml の氷酢酸に 0.5g のポンソーS を溶解する ☒ 蒸留水で 100ml に希釈する ☒ 照明から溶液を保護するためにアルミホイルで瓶をラップする。	**ポンソー染色溶液** 1L **に対し**: ☒ 10 倍の**ポンソーS 染色溶液** 100m ☒ 蒸留水で 1L に希釈する

適用可能なゲル撮影装置

- ☒ ImageQuant™LAS-4000/Mini (GE Healthcare)
- ☒ DIAS-II (SERVA)
- ☒ ChemiDocXRS 並びに VersaDoc (BIO-RAD)
- ☒ ChemiImager (Alpha Innotech)
- ☒ Image Station 2000/40000MM (Kodak)
- ☒ FOTO/Analyst Luminary/FX Systems (Fotodyne)
- ☒ LAS-3000 (Fujifilm)
- ☒ UVIchemi 並びに UVIprochemi (UVItec Ltd.)
- ☒ G:BOX/GeneGnome (Syngene)
- ☒ Odyssey FC (LI-COR)

3. SDS-PAGEの実施

i. 新鮮な**ランニングバッファー溶液**を準備します。
ii. ゲルキャストとガスケット間の高いシール性能を維持するよう注意し、ゲルをロードします。
iii. ゲルの中央に**ランニングバッファー**を注ぎ、漏れがないかを確認します。
iv. タンクの底部に残りの**ランニングバッファー**を注ぎます。
v. コームを取り外し、未重合のアクリルアミドの痕跡を洗浄するためにピペットを使用します。

vi. トラックに**分子量マーカー**Pre-Stained Standard　をロードします。

vii. 残りのウェルにサンプルをロードし、同サンプルバッファーで隙間があれば埋めます。
viii. 色素のフロントがゲルの底に到達するまで、90～130V　の一定電圧で実行します。電流が高すぎると、弧状バンド又はデバリング（拡散バンド）が形成されることがあります。

4. メンブレン転写の準備

ニトロセルロースメンブレンを使用する場合、端が45℃になるように、ゆっくりと蒸留水に浸漬されなければいけません。あまりにも速く蒸留水に挿入した場合、空気がトラップされ、タンパク質がこの領域に移動しません。メンブレンが湿っている場合には、15分間**トランスファーバッファー**内で平衡化してください。
PVDFメンブレンを使用する場合は、30秒間メタノールで活性化させてください。蒸留水ですすぎ、15分間**トランスファーバッファー**内で平衡化してください。

☒ 15 kDa **以上のタンパク質には 孔径**0,45 µ **のメンブレンを使用してください。**
☒ 15 kDa **以下のタンパク質には 孔径**0,2 µ **のメンブレンを使用してください。**

注記：低分子量（<15kDa）のタンパク質は、ニトロセルロースメンブレンを介して転写されることがあり、その場合ブロット上に表示されない場合があります。PVDFメンブレンは、ニトロセルロースメンブレンに比べタンパク質に対する結合能力が優れており、その優れた検出感度から推奨に値します。

5. メンブレンへの転写

i. **トランスファーバッファー内**でろ紙を 4 枚湿らせます。

ii. 転写用のプラスチックケースを収容するのに十分な大きさのトレイに転写用サンドイッチ板をセットします。ケースが完全に覆われるまで**トランスファーバッファー**を注入してください。

iii. 転写用パレットの黒い方の面にまず、フォームパッドを配置します。その後予め湿らせておいたろ紙を２枚フォームパッドの上にセッティングします。

iv. ゲルをセットし、**トランスファーバッファー**で表面を湿らせます。

v. ゲルの上に予め湿らせたメンブレンを置き、優しく気泡をすべて除去します。ゲルがメンブレン上に配置されるとすぐにタンパク質が転写され始める為、再配置すると、ぼやけた画像になることがあります。

vi. **予め湿らせておいた残り２枚のろ紙**をメンブレンの上にセットし、すべての気泡を除去します。

vii. 最後に別のフォームパッドをセットし、転写用カセットの上部をロックすることでセッティングを完了します。

viii. 転写用タンクを**トランスファーバッファー**で満たし、転写カセットを挿入します。

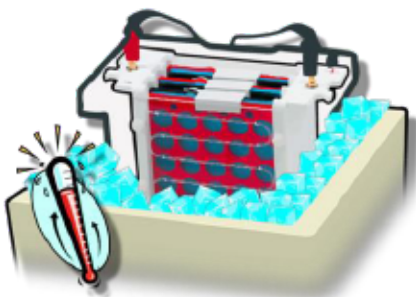
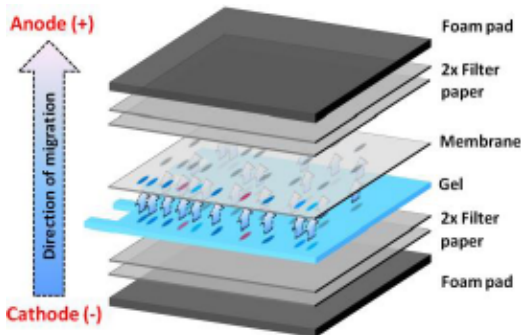
ix. 凍結させた転写ユニットを転写タンクに侵入し、ポリスチロールのボックスに入れ氷で囲います。

x. 下記の設定で転写を実行します：

ウエット転写: 80-100 V で 30～60 分

セミドライ転写: 15-25 V で 20～30 分

xi. 転写が完了したら、メンブレンを削除し、向きをマークする為、コーナーを切断してください。

xii. **蒸留水でメンブレンを二度洗いしてください。**

転写時の電圧または定電流は？

バッファーの組成は、電流の増加及び強度の低下を引き起こしながら、ゲルからの塩の溶離によって変化します。一定の電流下における転写は、強度はもちろん、電圧の低下をもたらします。（I= V/ R）従いまして、一定電圧の使用は、転写時に最高の駆動力を提供します。但し、電流が定電圧設定 500mA を越えると、タンク内のジュール加熱を避けるため、ゲルの冷却が不可欠です。

6. メンブレンの染色（オプション）

i. 転写の効率を決定的とするために、室温で 5 分間**ポンソー染色液**を用いて転写されたタンパク質側を上にしてメンブレンの表面を染色します。
ii. タンパク質バンドが明確になるまで蒸留水でメンブレンをすすいでください。
iii. 必要に応じてメンブレンをスキャンします。
iv. 充分な量の蒸留水に 10 分間浸漬し、メンブレンを完全に脱色します。
v. メタノールで PVDF メンブレンを再活性させ、TBS-T **バッファー**で洗浄します。

注意:

- バックグラウンドの染色は、染料によって高くなる傾向があるのに対し、ポンソー染色溶液は、非常にきれいなパターンのバックグラウンドを生成します。
- 染色後にメンブレンを再活性させてください。
- ポンソー溶液の検出限界は、タンパク質 250ngです。

7. メンブレンのブロッキング

i. お好みの**ブロッキングバッファー**を使用して新しいトレイにタンパク質側を上にしてメンブレンを設置します。シェーカー又は攪拌機で穏やかに撹拌しながら 30~60 分間**ブロッキングバッファー**内でメンブレンをインキュベートします。
ii. ブロッキング時間は室温で最長時間である 2 時間を超えてはいけません。ブロッキング時間が長すぎると、抗原のマスキングやタンパク質の損失をもたらすことがあります。
iii. TBS-T **バッファー**でメンブレンを 2 回すすいでください。

注意: 抗体を希釈する際、非特異的結合を低減するために TBS-T **バッファー**内に脱脂粉乳 3%を加えます。ミルクはメンブレンと結合するタンパク質を多く含みます。そのため、転写後、ミルクに含まれるタンパク質がメンブレンと結合し、非特異的部位の大部分を埋めます。その後、抗体とインキュベートした際、抗原に結合し、非特異的結合を形成する可能性が少なくなります。抗リン酸化タンパク質またはビオチン化のような抗体を利用し作業する場合、ミルクを追加することは適切ではありません。5%のウシ血清アルブミン（BSA）を代用してください。

8. 抗体のインキュベーション

i. 一次抗体の希釈に推奨される新鮮な TBS　バッファー内で一次抗体を希釈します。（下表参照）
ii. 一次抗体溶液を用いタンパク質側を上にしてメンブレンの表面を 1〜2 時間室温でインキュベートします。感度を高めるために、シェーカーで攪拌しながら 4℃で一晩インキュベーションしてください。メンブレンが完全に一次抗体を含む TBS　バッファーで覆われていることを確認してください。
iii. 毎回 TBS-T　バッファーを使用し、シェーカーで穏やかに攪拌しながら、タンパク質側を上にしたメンブレンの表面を全 4　回、3〜5　分間洗ってください。**洗浄毎に、新鮮な TBS-T バッファーの入った新しいトレイにメンブレンを配置してください。**
iv. 二次抗体の希釈に推奨される新鮮な TBS バッファーで二次抗体を希釈します。（下表参照）
v. 室温で 30 分から 1 時間、二次抗体溶液を用いてタンパク質側を上にしたメンブレンをインキュベートします。抗体のインキュベーションの時間を延長すると、通常、より高いバックグラウンドを生成します。
vi. 毎回 TBS-T　バッファーを使用し、シェーカーで穏やかに攪拌しながら、タンパク質側を上にしたメンブレンの表面を全 4　回、3〜5　分間洗ってください。**洗浄毎に、新鮮な TBS-T バッファーの入った新しいトレイにメンブレンを配置してください。**

注意: 最適な抗体希釈は、アプリケーションによって変わり、タンパク質の質並びに親和性にもよります。強いシグナルと低バックグラウンドを持つ最良の結果を得るためには、一次抗体並びに二次抗体共による希釈の最適化が重要となります。抗体の希釈の最適化はドットブロットアッセイで決定付けられることがあります。

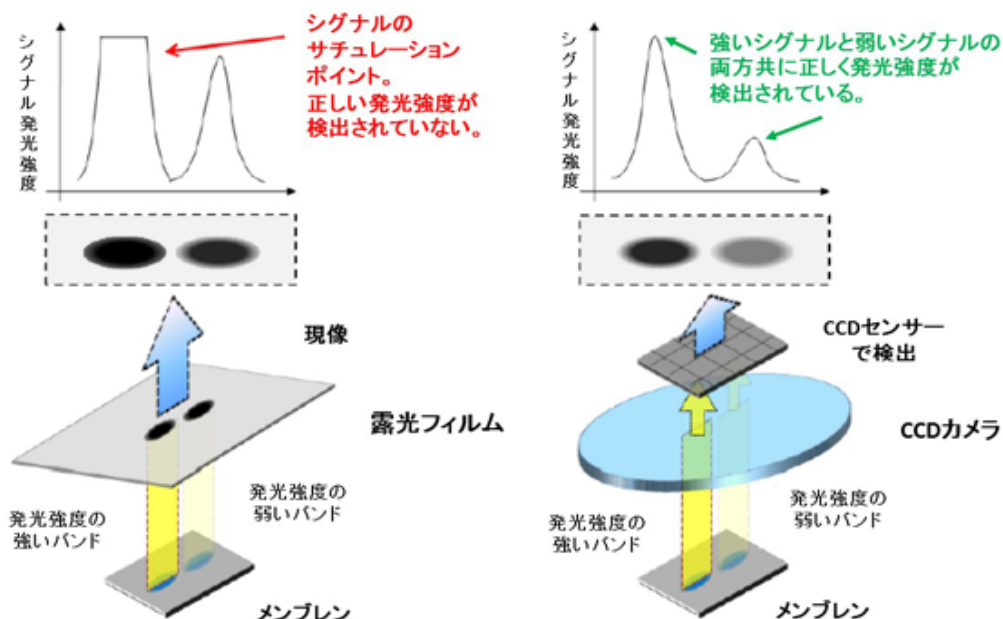
WESTAR SUPERNOVA 向けに推奨する抗体希釈倍率

☒ **一次抗体**..................1:5000 から 1:100000
☒ **二次抗体**..................1:100000 から 1:500000

9. 化学発光による検出

i. 再現性のある結果を得るには、使用前に室温で検出溶液を平衡にしてください。
ii. 各試薬を容量比 1：1 で混合し、ワーキング溶液を調製します。Westar ECL-Sun のワーキング溶液は+4℃で適切に保存した場合、少なくとも 5 日間は安定しています。同じピペットチップを使用して溶液を汚染しないようにしてください。
iii. TBS-T バッファーの入ったトレイからメンブレンを取り出し、**コーナー部から余分なバッファーを除去してください。**メンブレンを乾燥させないようご注意ください。
iv. メンブレン 1cm^2 あたり 0.1ml のワーキング溶液を使用してください。
v. 必要なボリュームをタンパク質側を上にしてメンブレンに直接ピペットし、表面全体が覆われていることを確認しながら 1 分間インキュベートします。
vi. オートラジオグラフィー用フィルム、もしくは画像取得用機器を使用しシグナルを取得します。シグナル強度が未知の場合は、最初に 15 秒、30 秒、1 分そして 5 分間露出を試みてください。

オートラジオグラフィー用フィルムかCCDカメライメージャーか？

現在、ウエスタンブロットは絶対的定量化のために、（既知濃度の組み替えタンパク質の較正曲線と組み合わせて）または参照試料に対する試料の定量化に向けて使用されています。新技術の開発により、CCDカメライメージャー のほとんどは､幅広いダイナミックレンジ(オーダーサイズ 3~5)を持ち、高画質な画像を得ることができます。ゆえに、シグナルの強いバンドと弱いバンドの両方を同時に同じブロット上で定量でき､信頼性の高い結果を得ることができます｡一方フィルム撮影では､ダイナミックレンジが1.5オーダーサイズで､直線性に限界があるため､強いシグナルは飽和状態となり､正しい定量結果が得られないことがあります。

10.　トラブルシューティング

高いバックグラウンドを伴うメンブレン

抗体の濃度が高すぎる　一次および二次抗体をさらに希釈してください。推奨される希釈液に従ってください。

非効率的なブロッキング　TBS-Tバッファー中のTween-20の濃度を上げてください。0.1～0.5%v / v）できれば、ブロッキングバッファーとして5%の脱脂粉乳を使用してください。

不十分な洗浄　量、時間、並びに洗浄回数を増やしてください。常にメンブレンが浸漬している状態を維持するのに十分な量を使用してください。

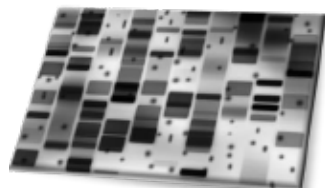
目的タンパク質に対する一次抗体が特異的でない　単一特異性抗体、または抗原とアフィニティークロマトグラフィー用に精製された抗体を使用してください。常に室温ではなく4℃で一晩、一次抗体をインキュベートしてください。TBS-Tバッファー内のNaClを減少させてください。（100～350 mM）

非特異的結合を有する二次抗体　二次抗体が、一次抗体を省略し、二次抗体のみをブロットさせることにより、特異的であることを確認してください。バンドが拡大する場合、別の二次抗体を選択してください。

互換性のないブロッキング剤　脱脂粉乳には、内因性ビオチンが含まれており、アビジン/ストレプトアビジンシステムとの互換性がありません。5%のウシ血清アルブミン（BSA）に代替えしてください。

低品質の抗体　一次および二次抗体の質と鮮度が高いバックグラウンドの問題の原因となる可能性があります。

メンブレンの不適切な取り扱い　クリーンなプラスチック製ピンセットとパウダーフリーの手袋のみを使用しメンブレンを処理するようにしてください。

汚染されたバッファー溶液　バッファーに粒子または細菌汚染物質が存在するかどうか確認してください。古いバッファーは交換してください。

不規則な黒い斑点

メンブレン中にトラップされた気泡　サンドイッチ状に組立てする際、メンブレン上にゆっくりピペットまたは試験管を転がし気泡を除去してください。

不均一に水和したメンブレン　洗浄の際や抗体とインキュベーション中にメンブレンが完全に浸漬されていることを確認してください。

汚染された器具　ユニット上に残ったタンパク質またはゲル片は、メンブレンに付着することがあります。抗体は、ゲル中に閉じ込められることがあり、うまく洗浄されないことから、局部的な強度のシグナルの生成をもたらします。

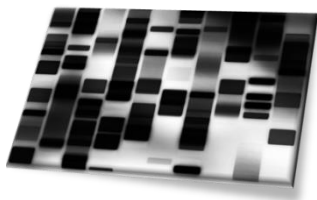
ブロッキング剤の凝集　粉末のブロッキング剤をご利用の際は完全に溶解することを保証するために、、4℃で一晩撹拌してください。

メンブレンとサンプルトレイの相互作用　あらゆるタイプの交差反応を避けるために、常に清潔なプラスチックのトレイを使用してください。

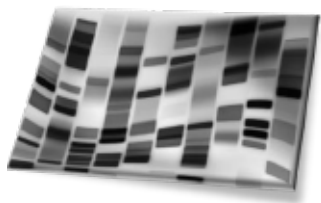
HRP 結合体における凝集体の形成　0.2 μm のフィルターを介して二次抗体溶液をフィルタリングしてください。新鮮な抗体を使用してください。

バンドが検出されない、もしくは薄い場合

過度のシグナル　システム内の酵素が、基質を消耗し、即時にシグナルの消失を促したと考えられます。二次抗体をさらに希釈してください。
非効率的な転写　サンドイッチのアッセンブリー時にメンブレンとゲルが充分接触していることを確認してください。分子量の高いタンパク質は、転写により時間を必要とすることがあります。電圧または低分子量のタンパク質の転写時間を低減してください。（<10 kDa）
抗体が不活性となる可能性のある場合　ドットブロットを行います。メーカーの推奨するストレージの手順に従い、凍結/融解を繰り返さないようにしてください。
誤った二次抗体の使用　一次抗体のホスト/ Igの種類を確認してください。
タンパク質 - 抗体の親和性が低い　洗浄回数を最小限に減らしてください。TBS-Tバッファー中のNaClを減らしてください。（100mM～350mM）
脱脂粉乳がいくつかの抗原をマスキングした可能性のある場合　ブロッキング時間を短縮してください。ブロッキングバッファー内のミルクの割合を減少させるか、もしくはBSA5%のブロッキングバッファーを代用してください。
アジ化ナトリウムによる汚染　HRPのシグナルを消滅させてしまうため、アジ化ナトリウムがバッファーに含まれていないことを確認してください。
ストック溶液の汚染　同じピペットチップを用いて基板のストック溶液を汚染しないようにしてください。新鮮な試薬をお使いください。

非特異的バンド

分析物の凝集. ジスルフィド結合の完全な還元を確かなものとするために還元剤の量を増やしてください。
SDS干渉　SDSの存在は、タンパク質に関連するSDSの荷電分子に結合する抗体を起因とする非特異的バンドの生成に繋がることがあります。転写後は水で十分にメンブレンを洗浄してください。
高濃度のタンパク質　一般的に述べられている効果としては、タンパク質バンドの拡散です。初めにロードされたタンパク質の量を減らしてください。
一次抗体が、目的タンパク質に対し特異的でない　単一特異性抗体を使用する、もしくは抗原を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製した抗体を使用してください。室温ではなく、常に4℃で一晩一次抗体をインキュベートしてください。TBS-Tバッファー中のNaClを低減してください。（100～350 mM）
二次抗体の非特異的結合　一次抗体を省略し、二次抗体のみでブロットを実行することにより、二次抗体が特異的であることを確認してください。バンドが発生する場合は、別の二次抗体を選択してください。

白抜けのバンドまたは「ゴーストバンド」

過度のシグナル　抗体またはロードされたタンパク質の量が過剰な場合、ローカライズされた過度のシグナルを引き起こすことがあります。これは、この領域で基質が急速に消費したことから起こります。この反応が終了した後、発光がない為白抜けのバンドが形成されます。まず第一に、二次抗体をさらに希釈してみてください。

不規則なバンドまたは刻み目のあるバンド

ゲルのランニングが不均一である　利用可能なすべてのウェルをロードしてください。空のウェルは、同じサンプルバッファーでロードすることが可能です。
電気泳動中の電圧または電流が高すぎた　電気泳動時の電圧もしくは電流を低下させてください。
過剰な塩分　TBS-T バッファー中の NaCl の濃度を下げてください。（100～350 mM）

11. オーダーガイド

製品名	容量	対キャパシティ	オーダー番号
WESTAR ECL -SUN	50mL kit	対メンブレン 500 cm^2	XLS063,0050
	250mL kit	対メンブレン 2500 cm^2	XLS063,0250
	500mL kit	対メンブレン 5000 cm^2	XLS063,0500
WESTAR Nova 2011	50mL kit	対メンブレン 500 cm^2	XLS10,0050
	100mL kit	対メンブレン 1000 cm^2	XLS10,0100
	250mL kit	対メンブレン 2500 cm^2	XLS10,0250
	500mL kit	対メンブレン 5000 cm^2	XLS10,0500
WESTAR EtaC	50mL kit	対メンブレン 500 cm^2	XLS100,0050
	100mL kit	対メンブレン 1000 cm^2	XLS100,0250
	500mL kit	対メンブレン 5000 cm^2	XLS100,0500
WESTAR EtaC Ultra	20mL kit	対メンブレン 200 cm^2	XLS4,0020
	100mL kit	対メンブレン 1000 cm^2	XLS4,0100
	200mL kit	対メンブレン 2000 cm^2	XLS4,0200
WESTAR Supernova	20mL kit	対メンブレン 200 cm^2	XLS3,0020
	100mL kit	対メンブレン 1000 cm^2	XLS3,0100
	200mL kit	対メンブレン 2000 cm^2	XLS3,0200
WESTAR Starter Kit	WESTAR ECL-SUN - 50mL kit		XLS025,0000
	WESTAR Nova 2011 - 50mL kit		
	WESTAR EtaC - 50mL kit		
	WESTAR EtaC Ultra - 20mL kit		
	WESTAR Supernova - 20mL kit		

MSDS やその他詳細に関する情報をお求めのお客様、
また製品の使用説明書をダウンロードされたい方は
下記のサイトをご覧ください。

http://www.nmkkk.co.jp/

www.cyanagen.com

お問い合わせ

輸入元

時代と時代を結ぶ確かな技術　あなたの"欲しい"を、世界から

中村科学器械工業株式会社　GloboLab

新規事業推進部
〒103-0001　東京都中央区日本橋小伝馬町18-10
Tel:03-3661-4662　Fax:03-3661-0369
http://www. nmkkk.co.jp/

製造元：有限会社 Cyanagen 登録事務所: Via degli Stradelli Guelfi 40/C
40138 Bologna (Italia) - Tel/Fax: +39 051.534063 - Email: info@cyanagen.com
納税者番号/付加価値税（VAT）02360111203 ボローニャ商工会議所記載　n.REA: 433637 -資本金 € 10.000,00
Finance & Technology 有限会社管理下による　法令 2497 bis cc.
納税者番号/付加価値税（VAT） 02958121200 -資本金 € 119.000,00

全てのWESTAR基板は、特許 US7803573、EP1962095、US7855287、EP1950207、US2012009603（A1）、CA2742025、EP2405016 によって海外においても同様に保護されています。

本製品 WESTAR の使用は研究のみを目的とするものです。
これらの製品を臨床試験または診断目的でご利用されることは
お控えください。